



(21) Aktenzeichen: P 43 45 200.0
(22) Anmeldetag: 14. 4. 93
(43) Offenlegungstag: 22. 12. 94

DE 43 45 200 A 1

(71) Anmelder:
Fresenius AG, 61440 Oberursel, DE

(74) Vertreter:
Stolberg-Wernigerode, Graf zu, U., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Suchantke, J., Dipl.-Ing.; Huber, A.,
Dipl.-Ing.; von Kameke, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Voelker, I., Dipl.-Biol.; Franck, P., Dipl.-Chem.ETH
Dr.sc.techn.; Both, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; van
Heesch, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Gross, U.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Stürken, J., Dipl.-Biol.;
Ahme, J., Dipl.-Phys.Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 22607
Hamburg

(62) Teil aus: P 43 12 916.1

(72) Erfinder:
Schuh, Rolf, 81929 München, DE; Thierfelder,
Stefan, 82223 Eichenau, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Arzneimittel zur Behandlung von Immunreaktionen

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Behandlung von T-Zell-spezifischer Immunreaktionen und von T-Zell-Leukämien, welches mindestens vier monoklonale Antikörper unterschiedlicher Spezifität gegen die humanen Lymphozytenmarker CD5 und CD7 enthält, wobei zwei der monoklonalen Antikörper gegen zwei nicht-überlappende Epitope des Lymphozytenmarkers CD5 und die beiden anderen gegen zwei nicht-überlappende Epitope des Lymphozytenmarkers CD7 gerichtet sind. Das erfindungsgemäße Arzneimittel erlaubt eine wirksame Suppression von Immunreaktionen bei Organ- oder Knochenmarktransplantationen, ohne die Nebenwirkungen hervorzurufen, die mit bisher bekannten Antikörper-Präparaten beobachtet worden sind.

DE 43 45 200 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Behandlung T-Zell-spezifischer Immunreaktionen und von T-Zell-Leukämien, welches als Wirkstoff eine Kombination aus mindestens vier monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität enthält, wobei zwei der Antikörper gegen unterschiedliche, nicht-überlappende Epitope des humanen Lymphozytenmarkers CD5 und die beiden anderen gegen unterschiedliche, nicht-überlappende Epitope des humanen Lymphozytenmarkers CD7 gerichtet sind.

Das Arzneimittel hat sich als äußerst wirksam für die Behandlung von Leukämie, Autoimmunerkrankungen und für die Suppression von Immunreaktionen bei Organ- oder Knochenmarktransplantationen erwiesen, ohne die im Zusammenhang mit bisher im Stand der Technik bekannten Antikörperpräparaten beobachteten Nebenwirkungen zu erzeugen.

Der "Lymphozytenmarker" CD5 ist ein antigen wirksames Molekül, welches auf praktisch allen normalen peripheren T-Zellen sowie auf einer Subpopulation der normalen peripheren B-Zellen exprimiert wird, die sogenannte polyreaktive IgM-Antikörper produzieren. Der "Lymphozytenmarker" CD7 ist ein antigen wirksames Molekül, welches innerhalb der Lymphozytenpopulation auf den meisten normalen peripheren T- und NK-Zellen (Natural Killer Cells) exprimiert wird.

Das erfundungsgemäße Arzneimittel erfaßt somit ein breites, aber genau definiertes Spektrum von Zielzellen, wodurch eine äußerst wirksame Suppression von Immunreaktionen bei Organ- oder Knochenmarktransplantationen erreicht wird.

T-Lymphozyten (T-Zellen) entwickeln nach Kontakt mit fremden Antigenen eine zelluläre Immunantwort. Im Falle einer allogenen Organtransplantation erkennen die T-Zellen des Wirts die Zellen des Spenderorgans als fremd; der Patient entwickelt eine Wirtgegen-Spender-Erkrankung. Im Falle einer allogenen Knochenmarktransplantation erkennen die mit dem Spenderknochenmark übertragenen oder daraus nachreifenden T-Zellen den Wirt als fremd; der Patient entwickelt eine Spender-gegen-Wirt-Erkrankung (graftversus-host-disease; GvHD). Im Falle einer Autoimmunerkrankung erkennen die T-Zellen des Patienten aufgrund einer Fehlregulation körpereigenes Gewebe als fremd.

Im ersten Schritt wird durch die als fremd erkannten Antigene eine Proliferation der T-Lymphozyten ausgelöst und die Induktion von Helfer- und zytotoxischen T-Zellen stellt die erste Stufe der T-Zell-spezifischen Immunreaktionen dar. Von T-Zellen können im weiteren Verlauf chemotaktisch wirksame, d. h. unter anderem Makrophagen anlockende, sowie mitogene Substanzen und γ -Interferon freigesetzt werden. Als Folge der T-Zell-Antigen-Reaktion kommt es zur Ausschüttung zytotoxischer Substanzen, die das Fremdantigen enthaltende Zellen abtöten. Im Fall einer Organtransplantation wirkt sich diese Zellzerstörung makroskopisch in einer Abstoßung des Transplantats aus. Im Falle einer Knochenmarktransplantation kommt es makroskopisch zu Abstoßungserscheinungen hauptsächlich am Darm, Leber und Haut.

Als eine weitere Effektorzellpopulation für die Vermittlung von Abstoßungserscheinungen — zumindest bei der GvHD — kommen nach neuestem Kenntnisstand auch NK-Zellen in Frage. Zudem könnten CD5⁺ B-Zellen an der Induktion einen humoralen Immunantwort beteiligt sein.

Eine Möglichkeit, Abstoßungserscheinungen prophylaktisch oder therapeutisch zu beeinflussen, besteht in der Zerstörung bzw. Inaktivierung der Effektorzellen. Möglich ist dies durch Verwendung spezifischer polyklonaler oder monoklonaler Antikörper. Durch die Bindung von Antikörpern an ihre Zielzellen können in vivo und in vitro zelleliminierende Mechanismen, wie zum Beispiel das Komplementsystem, angeworfen werden.

Eine der möglichen Konsequenzen der Komplementaktivierung ist die sequentielle Zusammenfügung der sogenannten späten Komplementkomponenten (C5, C6, C7, C8 und C9) zu einem großen Proteinkomplex, der dann die Zell-Lyse vermittelt (Müller-Eberhard, Springer Semin. Immunopathol., 7, 93 (1984)).

Neben der lytischen Funktion trägt das Komplementsystem auch zur Initiierung zellulärer Effekte und Mechanismen bei. Bekannt sind zum Beispiel Komplement-Rezeptoren auf Makrophagen, durch die diese Effektorzellen die Zielzellen erkennen, auf denen die Komplementaktivierung stattgefunden hat (Tenner und Cooper, J. Immunol. 1981, 126, 1174). Es würde auch eine Stimulation der Makrophagen-vermittelten, Antikörper-abhängigen Zytotoxizität beschrieben (Leu et al., J. Immunol. 1989, 143, 3250).

Die erste Komponente der klassischen Komponentenkaskade ist C1, ein pentameres Molekül, dessen größte Untereinheit, C1q, die Bindung zwischen C1 und den Fc-Teilen von Immunglobulinen vermittelt (Cooper, Advances in Immunol. (Editor: Dixon) Academic Press, New York, 1985, 151). C1q besteht aus sechs beweglichen kollagenen Armen mit je einem globulären Bindungskopf. Die Affinitätskonstante einer monovalenten Bindung zwischen einer C1q-Bindungseinheit und einem IgG-Molekül ist jedoch so schwach, daß eine stabile Bindung von C1q an IgG-besetzte Zellen oder Immunkomplexe nur dann zustande kommt, wenn C1q mit mindestens zwei Bindungseinheiten an nebeneinander fixierten Antikörpern binden kann (Hughes-Jones, Immunology, 1978, 32, 191).

Im Stand der Technik sind folgende Parameter bekannt, die eine C1q-Bindung an IgG-besetzte Zielzellen bedingen und die C1-Aktivierung bedingen: (1) der Isotop des verwendeten Antikörpers und (2) die Expressionsdichte des Zielantigens.

Der Isotop vermittelt die Affinität von C1q an den Fc-Teil der Antikörper. Von den gut untersuchten Maus-, Ratten- und Mensch-Isotypen weisen Maus-IgG2b und Maus-IgG2a, Ratte-IgG2b und Mensch-IgG1 und Mensch-IgG3 eine hohe C1q-Affinität auf (Füst et al., Immunol. Lett. 1980, 1, 249; Schumaker et al., Biochemistry 1976, 15, 5175).

Die Expressionsdichte der Antigene determiniert die möglichen C1q-Bindungsstellen. Daher muß die Antigendichte auf der Zielzelle theoretisch einen gewissen Schwellenwert überschreiten, so daß der durchschnittliche Abstand zwischen zwei benachbart gebundenen Immunglobulinen innerhalb der Spannweite eines C1q-Moleküls liegt (Hughes-Jones et al., Eur. J. Immunol. 1985, 15, 976).

Alternativ kann ein C1q-Molekül auch an zwei unterschiedliche Antikörper binden, die gegen zwei sich nicht überlappende Epitope auf demselben Antigen gerichtet sind (sogenanntes synergistisches Antikörperpaar). Nach Hughes-Jones et al. (Eur. J. Immunol. 1984, 14, 974) stellt jedes Antigen unabhängig von der Expressionsdichte eine potentielle C1q-Bindungsstelle dar, wenn geeignete Antikörperpaare vorliegen, die innerhalb der Spannweite von C1q zwei Epitope dieses Antigens binden.

Eine gewisse Korrelation zwischen der in vitro meßbaren Bindung von C1q gegenüber einer gegebenen Antikörperpräparation und deren zelldepletorischen Potenz in vivo wurde von Kummer et al. (J. Immunol. 1987, 138, 4069) beschrieben. Es wurde bislang jedoch noch kein gesicherter Nachweis für einen direkten kausalen Zusammenhang geliefert.

Im Stand der Technik ist die Verwendung von Antikörperpräparaten gegen T-Zellen und andere Leukozyten zur Immunsuppression, zur Leukämietherapie und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen bekannt.

Zur Reduktion von Leukämiezellen wird entweder das zu transplantierende Knochenmark vor einer autologen Knochenmarktransplantation in vitro behandelt, oder es können in vivo-Behandlungen zum Erreichen einer Remission erfolgen.

Bei der Reduktion immunkompetenter Zellen zur Verhinderung bzw. Behandlung einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) nach allogener Knochenmarktransplantation erfolgt entweder eine in vitro-Behandlung des Spender-Knochenmarks, oder der Empfänger wird vor oder nach der erfolgten Transplantation mit entsprechenden Antikörpern in vivo behandelt.

Bei Organtransplantationen lässt sich durch eine in vivo-Behandlung des Transplantat-Empfängers die Zahl immunkompetenter Zellen reduzieren, um Abstoßungen zu verhindern bzw. zu unterdrücken. Autoimmunerkrankungen können mit einer vergleichbaren Therapie behandelt werden.

Die in der Klinik eingesetzten Antikörperpräparate können entweder zu einer Elimination der Zielzellen durch Aktivierung körpereigener Effektormechanismen führen oder die Funktionsbereitschaft der Zielzellen verändern, wie z. B. durch Blockade oder Aktivierung von funktionsrelevanten Rezeptoren, z. B. IL2-Rezeptor.

Neben der Applikation von unmodifizierten Antikörpern wird auch die Verwendung Toxin- oder Radionuklid-konjugierten Antikörpern praktiziert. Während Antikörper selbst zu einer Aktivierung natürlicher Effektormechanismen führen (Elimination der Zielzellen oder Veränderung ihres Funktionszustandes), kann im Fall der Antikörper-Toxin-Konjugate eine giftige Komponente direkt an die Zielzellen transportiert werden (in vitro und in vivo). Darüber hinaus kommen auch Antikörper in Frage, die gentechnologisch oder chemisch verändert werden, z. B. durch den Austausch konstanter Regionen, durch Kopplung von Antikörpern unterschiedlicher oder gleicher Spezifitäten, durch Anfügen oder Entfernen funktioneller Komponenten, wie z. B. durch Anfügen von Enzymen oder Entfernen des Fc-Teils der Immunglobuline u. ä.

Bekannte immunsuppressive Antikörperpräparate sind beispielsweise monoklonale Antikörper gegen das humane CD3-T-Zellantigen (OKT3) und polyklonales Antiserum gegen humane T-Zellen (ATG).

Die typischen Nebenwirkungen von ATG beruhen auf dem polyklonalen Charakter des Präparates, das mit seiner breitgefächerten Spezifität neben T-Zellen auch noch eine Vielzahl anderer Zellen erkennt. So kommt es neben ausgeprägten Lymphozytopenien auch zu Thrombo- und Granulozytopenien, die in einigen Fällen den Abbruch der immunsuppressiven Antikörper-Therapie mit ATG erforderlich machen. Durch die massive Zelleliminierung wird eine große Zahl von Zellinhaltsstoffen und Immunmediatoren freigesetzt, was neben Unverträglichkeitsreaktionen insbesondere zu Beginn der Behandlung zu Blutdruckabfall, Thoraxschmerzen, Fieberreaktionen, Durchfällen und Juckreiz führt (ATG-Fresenius, Informationsbroschüre).

Die für polyklonale Antikörperpräparate typischen pleiotropen Nebenwirkungen können durch Verwendung monoklonaler Antikörper stark eingeschränkt werden, da diese aufgrund ihrer Antigenspezifität ihre Zielzellpopulation selektiv erkennen können. Jedoch kommt es wegen der im Vergleich zu polyklonalem Antikörperpräparat geringen Bindungsdichte auf diesen Zellen zu einer nur milde verlaufenden Zelleliminierung.

Andererseits weisen monoklonale Antikörper einen hohen spezifischen Titer auf, so daß unerwünschte Reaktionen, die gegebenenfalls durch die spezielle Antigen/Antikörper-Interaktion initiiert werden, massiv und ungebremst ablaufen können.

So zeigt das Antikörperpräparat OKT3 in vivo deutliche Nebenwirkungen, die auf der initialen Stimulation der CD3⁺-T-Zellen sowie der damit verbundenen massiven Freisetzung an Immunmediatoren basieren. Diese außerst vielfältigen Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Fieber (73%), Schüttelfrost (57%), Atemnot (21%), pektanginöse Beschwerden (14%), Spastik (11%), Übelkeit (11%), Erbrechen (13%) und Durchfall (20%), können lebensbedrohlich sein (Todd und Brodgen, Drugs 1989, 37, 871).

Neben einer initialen Stimulation der T-Zelle induziert OKT3 die Modulation des CD3-Antigens und bewirkt somit einen funktionslosen, sogenannten anergischen Zustand.

Die meisten monoklonalen Antikörper gegen das humane CD3-Antigen weisen – abhängig vom Isotyp und dem Vorhandensein entsprechender Fc-Rezeptoren auf sogenannten akzessorischen Zellen wie Monozyten und Granulozyten – ähnliche stimulatorische Eigenschaften in vitro und klinische Nebenwirkungen in vivo auf wie OKT3 (Rao et al. Human Immunol. 1992, 37, 275).

Daneben sind eine Reihe CD5-spezifischer Antikörper im Stand der Technik bekannt, die in vitro eine costimulierende (Ledbetter et al., Mol. Immunol. 1989, 26, 137; Vandenberghe und Ceuppens, Eur. J. Immunol. 1991, 21, 251) beziehungsweise eine stimulierende (Spertini et al., J. Immunol. 1991, 146, 47) Wirkung auf T-Zellen ausüben können. Nach Lydyard und MacKenzie (Leucocyte Typing IV (Editor: Knapp et al.), Oxford University Press 1989, 338) konnte keine Korrelation mit dem Isotyp des Antikörpers festgestellt werden, jedoch ist die Stimulationspotenz auch bei CD5-spezifischen Antikörpern vom jeweiligen Fc-Rezeptortyp auf den akzessorischen Zellen abhängig. Eine Korrelation der Epitopspezifität der verwendeten Antikörper scheint nicht zu bestehen.

Von Bertram et al. (Blood 1986, 68, 752) wurden im Zusammenhang mit der Verwendung eines CD5-spezifi-

schen Antikörpers bei T-Lymphom-Patienten zahlreiche Nebenwirkungen Juckreiz, Hautrötung, Kurzatmigkeit, Fieber, Durchfall, Erbrechen, Herzrhythmusstörungen und Blutdruckschwankungen beschrieben. Das Erscheinungsbild ist, wenngleich auch etwas abgeschwächt, ähnlich wie nach OKT3-Behandlung.

Neben monoklonalen Antikörpern gegen das CD5-Antigen sind auch entsprechende Antikörper gegen CD7 im Stand der Technik bekannt und wurden therapeutisch eingesetzt (Raftery et al., Transplant. Proceedings 1985, 17, 2737). Im Gegensatz zu CD3- bzw. CD5-spezifischen Antikörpern ist für Antikörper gegen das CD7-Antigen keine (co)stimulatorische Wirkung auf periphere T-Zellen beobachtet worden (Ledbetter et al., Mol. Immunol. 1989, 26, 137; Vandenberghe und Ceuppens, Eur. J. Immunol. 1991, 21, 251).

Außer der Verwendung von Antikörpern gegen ein T-Zell-Antigen zum Zweck der Immunsuppression durch Elimination von T-Zellen wurden im Stand der Technik auch Mischungen monoklonaler Antikörper gegen unterschiedliche T-Zell-Antigene verwendet. So beschrieben Uckun et al. (Blood 1990, 76, 1723) die in vitro-Anwendung einer Kombination aus je einem Toxin-konjugierten Antikörper gegen CD5 und CD7 zur Leukämiezellreduktion. Auch die Verwendung einer Mischung aus je einem Antikörper gegen CD2, CD5 und CD7 zusammen mit einer Komplementquelle in vitro ist im Stand der Technik bekannt (Autran et al. Exp. Hematol. 1987, 15, 1121).

Die in vivo-Wirkung synergistischer, d. h. gegen nicht-überlappende Epitope eines Antigens gerichteter, C1q-bindender Antikörper wurde unter anderem von Qin et al. (Eur. J. Immunol. 1987, 17, 1159) beschrieben. Der in Tierexperimenten nachgewiesene Synergismus wurde mit Hilfe von einem Antikörperpaar gegen das humane Leukozytenantigen CD45 zur Elimination immunregulatorischer Leukozyten aus der Spenderniere ex vivo in der Humanmedizin ausgenutzt (Brewer et al., Lancet, 1989, 934).

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, das monoklonale Antikörper enthält, die vorrangig mit humanen T- (und NK-)Zellen reagieren, und welches geeignet ist, durch Eliminierung oder Inaktivierung dieser Zielzellen klinisch manifeste Abstoßungsreaktionen wirksam zu unterdrücken bzw. zu verzögern, ohne die bei Verwendung der bisher bekannten Antikörperpräparate auftretenden Nachteile bzw. drastischen Nebenwirkungen hervorzurufen.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird das Arzneimittel nach Anspruch 1 vorgeschlagen, welches als Wirkstoff mindestens vier monoklonale Antikörper unterschiedlicher Spezifität enthält, von denen zwei gegen nicht-überlappende Epitope des Lymphozytenmarkers CD5 und zwei gegen nicht-überlappende Epitope des Lymphozytenmarkers CD7 gerichtet sind.

Während beim Übergang von polyklonalen zu monoklonalen Antikörperpräparaten wegen der Erhöhung der Antigen-Spezifität nicht nur mit einer Reduktion der beobachteten pleiotropen Nebenwirkungen sondern gleichzeitig auch mit einer verminderter Wirksamkeit zu rechnen ist, weist das erfindungsgemäße Arzneimittel überraschenderweise nicht nur in Zahl und Ausmaß drastisch reduzierte Nebenwirkungen auf, sondern es besitzt eine unerwartete, im Gegensatz zu den Stand der Technik bekannten monoklonalen Antikörperpräparaten signifikant erhöhte Wirksamkeit bei der Behandlung T-Zell-spezifischer Immunreaktionen. Das erfindungsgemäße Arzneimittel eignet sich aufgrund der effektiven Eliminierung bzw. Inaktivierung der T-Zellen zur wirksamen Behandlung bzw. Verzögerung klinisch manifester Abstoßungsreaktionen bei Organ- und/oder Knochenmarktransplantationen, zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen sowie von CD5- und/oder CD7-positiven Leukämien.

Mit der Auswahl synergistischer Antikörperpaare gegen das CD5- und das CD7-Antigen wird zum einen eine starke C1q-Antikörper-Bindung erreicht, zum anderen kann in besonders vorteilhafter Weise ein breites, aber genau definiertes Spektrum von Zielzellen erfaßt werden, wodurch eine äußerst wirksame Suppression von Immunreaktionen bei Organ- oder Knochenmarktransplantationen erreicht wird. So erfaßt das erfindungsgemäße Arzneimittel nicht nur praktisch alle T-Zellen, sondern vorteilhafterweise auch die das CD7-Antigen tragenden NK-Zellen, die in besonderer Weise für Abstoßungsreaktionen verantwortlich sind. Neben T-Zellen weisen auch etwa 10% der B-Zellen (polyreaktive, IgM-produzierende B-Zellen) das CD5-Antigen auf und stellen somit für das erfindungsgemäße Arzneimittel ebenfalls eine Zielzellpopulation dar. Daher wird mit dem Antikörperpräparat die erste humorale Reaktion auf Fremdantigene äußerst wirksam unterdrückt.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen Arzneimittels führt initial zu einer deutlichen Elimination der CD5- und/oder CD7-positiven Zielzellen aus dem peripheren Blut. Parallel und in Konkurrenz zu diesem Wirkmechanismus kommt es auf einigen Zielzellen zum Verlust der Zielantigene durch Modulation. Diese modulierten und daher CD5- und/oder CD7-negativen Zielzellen werden jedoch überraschenderweise bei der weiteren Anwendung des erfindungsgemäßen Arzneimittels nach ca. 5 bis 10 Tagen weiter deutlich reduziert. Voraussetzung hierfür ist eine Dosierung, die gewährleistet, daß der Serumspiegel für die Einzelkomponenten des erfindungsgemäßen Arzneimittels nicht auf Null absinkt.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen CD5 und CD7 führen im Gegensatz zu vielen, im Stand der Technik bekannten Antikörpern gegen CD3 oder CD5 weder einzeln noch in einer beliebigen Kombination zu einer signifikanten Stimulation der T-Zellen in vitro. Eine vom Blutzellspender bedingte Fc-Rezeptor-Heterogenität konnte ausgeschlossen werden.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung werden im Gegensatz zu den im Stand der Technik bekannten Antikörperpräparaten keine mit ATG vergleichbaren, d. h. pleiotropen, oder mit OKT3 vergleichbaren, stimulations-assoziierten Nebenwirkungen beobachtet.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel gestattet somit eine effektive Behandlung T-Zell-spezifischer Immunreaktionen, mit der sich klinisch manifeste Abstoßungsreaktionen wirkungsvoll verzögern bzw. unterdrücken lassen, ohne die bei bisher verwendeten Antikörperpräparaten auftretenden und zum Teil lebensbedrohlichen Nebenwirkungen hervorzurufen.

Obwohl eine Vielzahl verschiedener Isotypen zur erfolgreichen Immunsuppression eingesetzt werden kann, enthält das erfindungsgemäße Arzneimittel vorzugsweise Antikörper der Subklasse Ratte-IgG2b.

Weiterhin haben sich monoklonale Antikörper der Subklasse Maus-IgG2a, Maus-IgG2b, Mensch-IgG1 und Mensch-IgG3 als besonders vorteilhaft zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen Arzneimittel erwiesen.

Prinzipiell kommen für das erfindungsgemäße Arzneimittel aber auch IgG-Subklassen anderer Tiere in Frage, die eine hohe Affinität zu C1q aufweisen.

Neben der erfindungsgemäßen Verwendung monoklonaler Antikörper gegen die humanen Lymphozytenmarker CD5 und CD7 kann das Arzneimittel zusätzlich zwei monoklonale Antikörper gegen nichtüberlappende Epitope eines weiteren (dritten) Lymphozytenmarkers enthalten.

Darüber hinaus ist es von Vorteil, wenn in dem erfindungsgemäßen Arzneimittel wenigstens ein Antikörper mit einer toxischen Komponente konjugiert ist. Zum Beispiel können diese Toxine Ricin, Saporin, cis-Platin, oder Radionuklide sein, die in Form einer chemischen Bindung an den entsprechenden Antikörper gebunden sind.

Zudem können ein oder mehrere der in dem Arzneimittel enthaltenen Antikörper gentechnologisch modifiziert sein. Beispiele für in Betracht kommende Modifikationen sind: 1. Austausch konstanter Regionen gegen homologe Sequenzen von Antikörpern einer anderen Subklasse der gleichen oder einer anderen Spezies, vorzugsweise des Menschen. (Chimärisierung, Humanisierung); 2. Kopplung von Antikörpern untereinander zum Zwecke der effizienten Induktion von Effektormechanismen, vorzugsweise der Bindung von C1q (Dimerisierung); 3. Eliminierung von Teilen des Antikörpers, vorzugsweise des Fc-Teils oder eines Fab-Teils (monovalente Antikörper, Antikörperfragmente).

Eine weitere Modifikation betrifft die direkte und indirekte Kopplung mindestens eines Antikörpers an Komponenten bzw. Agentien, die eine physikalische Trennung bzw. Entfernung der Zielzellen erlauben oder allgemein eine Anreicherung oder Abreicherung ermöglichen. Als an die Antikörper gekoppelte Agentien kommen hierbei solche in Frage, die eine Kopplung auf Membranen gestatten oder magnetische Partikeln.

Das Arzneimittel entsprechend der vorliegenden Erfindung ist in der Lage, die Zahl der Leukämiezellen zu reduzieren, und es wird insbesondere zur in-vitro-Behandlung von autologem, zu transplantierendem Knochenmark verwendet, wobei das Knochenmark vorzugsweise mit dem Arzneimittel und einer lytischen Komplementquelle inkubiert wird. Des Weiteren ist die Verwendung des Arzneimittels zum Erreichen einer Remission in vivo von Vorteil, wenn man dem Leukämiepatienten das Arzneimittel i.v. in Form täglicher Dosen appliziert.

Das erfindungsgemäße Präparat aus monoklonalen Antikörpern gegen CD5 und CD7 ermöglicht auch nach allogener Knochenmarktransplantation die Reduktion der Zahl immunkompetenter Zellen zur Verhinderung und/oder Behandlung einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Dabei ist es von Vorteil, wenn das Arzneimittel vor der Transplantation zur in vitro-Behandlung des Spender-Knochenmarks verwendet wird, es führt aber wenigstens zum gleichen Effekt, wenn das Arzneimittel zur prophylaktischen und therapeutischen in-vivo-Behandlung des Knochenmark-Empfängers eingesetzt wird.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel ermöglicht darüber hinaus die Reduktion der Zahl immunkompetenter Zellen zur Verhinderung und/oder Behandlung von Abstoßungen nach Organtransplantationen, wobei das Arzneimittel dem Empfänger des Organtransplantats verabreicht wird.

Ebenso ist eine Therapie von Autoimmunerkrankungen möglich, wobei der Patient in vivo mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel behandelt wird.

Die erfindungsgemäß verwendeten monoklonalen Antikörper liegen in gereinigter Form vor, vorzugsweise gelöst in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS), gegebenenfalls versetzt mit einem oberflächenaktiven Mittel wie beispielsweise Tween 80, in einer Menge von beispielsweise 0,02%. bezogen die Gesamtlösung. Die Lösung kann die Antikörpermischung in Mengen von 0,5 bis 5. vorzugsweise 1 bis 3 und in besonders bevorzugter Weise 1 mg/ml enthalten, wobei die verschiedenen Antikörpertypen vorzugsweise in etwa gleichen Mengenanteilen vorliegen.

Eine derartige Lösung kann für die intravenöse Applikation vorgesehen sein, wobei die Tagesdosis 10 bis 30 mg Antikörperpräparat betragen kann. Vorzugsweise werden 2 x täglich je 6 bis 10 mg Antikörper gelöst in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung über einen Zeitraum von einer halben Stunde infundiert.

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper-Paare gegen die humanen Lymphozytenmarker CD5 und CD7 erfolgt im Prinzip durch eine gezielte Immunisierung von Ratten oder Mäusen durch i.p., i.v. oder s.c. Applikation des Antigens vorzugsweise in Form ganzer humarer T-Zellen (Lymphozyten, T-Zelllinie) oder von entsprechenden Zell-Lysaten oder (an-)gereinigten Oberflächenmolekülen.

Nach erfolgter Immunisierung werden je nach Komplexität des Antigens, seiner antigenen Wirkung, Art und Anzahl der Immunisierungsschritte und der physiologischen Bereitschaft des Tieres, eine Vielzahl von B-Lymphozyten zur Proliferation und Antikörperproduktion angeregt. Die sogenannten B-Blasten werden aus dem Tier gewonnen, vorzugsweise durch Entnahme der Milz und in vitro immortalisiert.

Die Immortalisierung erfolgt durch Polyethylenglykol-induzierte Zellhybridisierung, oder durch Elektrofusion mit einer in vitro lebens- und teilungsfähigen Myelomzelllinie. Geeignete Myelomlinien weisen vorzugsweise eine Azaguanin-Resistenz auf, die eine Selektion der immortalisierten B-Zell/Myelom-Hybride (Hybridome) ermöglicht.

Nach der Fusion werden die Zellen mit HAT-Selektionsmedium verdünnt und in entsprechende Kulturgefäße (z. B. 96-Lochplatten) überführt, so daß Einzelklone entstehen und getrennt manipuliert werden können. Jeder Einzelkロン sezerniert typischerweise identische Antikörper, die nicht immer gegen das gewünschte Antigen gerichtet sind.

Die Antikörper werden mittels geeigneter Testsysteme auf gewünschte Eigenschaften (z. B. Isotyp und/oder Spezifität) untersucht. Zur Bestimmung des Isotyps bietet sich ein subklassenspezifischer ELISA an, zur Bestimmung der Spezifität gegen humane T-Zellen ein Immunassay (z. B. EIA), der das Bindungsverhalten der Antikörper auf T- und nicht-T-Zellen (z. B. B-Zellen) untersucht. Klone, die geeignete Antikörper produzieren, werden in Flüssigmedium expandiert und wiederholt auf Einzelzellniveau rekliniert, bis eine stabile Zelllinie mit nahezu konstanten Eigenschaften generiert ist.

Die genaue Antigen-Spezifität der Antikörper kann in FACS-Doppelmarkierungsexperimenten auf humanen Blutlymphozyten mit Referenzantikörpern der gewünschten Spezifität (anti-CD5, anti-CD7) untersucht werden, wobei die Verteilung und Lage der doppelt- und einzelpositiven Zellen zur Beurteilung herangezogen werden. Die Antigenspezifität wird nach Immunpräzipitaten aus dem Solubilisat von humanen T-Zellen im Vergleich mit den durch Referenzantikörper präzipitierten Molekulargewichte bestätigt. Die relative Epitopspezifität der generierten Antikörper kann durch Kreuzinhibition im EIA ermittelt werden.

5 Die Antikörper werden von den Hybridomzellen in das Kulturmedium sezerniert; die technische Umsetzung dieses Vorgangs wird Fermentation genannt. Aus dem Fermentationsüberstand werden die Zellen durch Zentrifugation oder Filtration entfernt und die Antikörper durch Reinigung gewonnen. Dabei werden spezifische 10 immunologische und/oder physiko-chemische Parameter der Antikörper ausgenützt, um diese vorzugsweise durch chromatographische Verfahren selektiv anzureichern.

10 Die gereinigten Antikörper können lyophilisiert oder in geeigneten Puffern gelöst aufbewahrt werden, entweder tiefgefroren oder vorzugsweise bei 4°C.

Die Erfahrung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert.

15

Beispiel 1

Immunisierung, Fusion sowie Etablierung der Hybridomzelllinien RhCD5p, RhCD5q, RhCD7p und RhCD7q

20 Lou/C-Ratten wurden mit der humanen T-Zelllinie Molt-3 (American Type Culture Collection (ATCC), CRL 1552) bzw. humanen peripheren Lymphozyten aus dem Blut immunisiert, wobei die Zellen 3 Tage lang mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert worden waren. Das genaue Immunisierungsschema, das zur Etablierung der vier beschriebenen Zelllinien führte, ist in Tabelle 1 angegeben.

25 Drei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen und daraus eine Einzelzellsuspension gewonnen. Als Fusionspartner diente die Azaguanin-resistente, nicht produzierende Maus-Myelomlinie P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL 1580), die zuvor in einem Standardmedium (RPMI 1640, 10% fötales Kälberserum, Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren, Na-Pyruvat) expandiert wurde. Die Fusion erfolgte nach Standardprozeduren (Galfré et al., Nature 1977, 266, 550) mit Polyethylenglykol 1500. Pro Ansatz wurden 10^6 Ratten-Milzzellen und 50×10^6 Maus-Myelomzellen verwendet.

30 Nach der Fusion wurden die Zellen auf 96-Loch-Kulturplatten überführt. Dazu wurden sie so verdünnt, daß durchschnittlich ein Klon pro Loch zu erwarten war. Dem Standard-Medium wurde dabei das HAT-Supplement zugesetzt, das eine Selektion von fusionierten Zellen ermöglicht. Ca. 24 Stunden vor der Fusion wurden diese Kulturplatten mit einem Zellrasen aus Maus-Peritonealmakrophagen beschichtet, die das Anwachsen von Hybridomzellen in der sensiblen Phase nach der Fusion begünstigen.

35

40

45

50

55

60

65

Immunisierungsschema

Immunisierungen

5

Antikörper	Immunogen	1.	2.	3.	Fusion
------------	-----------	----	----	----	--------

10

RhCD5p	stim. PBL ⁺	0. Tag: 20x10 ⁶ ip. 20x10 ⁶ sc. [§]	44. Tag: 30x10 ⁶ ip.	83. Tag: 20x10 ⁶ ip. 20x10 ⁶ iv. [*]	86. Tag
--------	------------------------	--	------------------------------------	---	---------

15

20

RhCD5q	stim. PBL	0. Tag: 20x10 ⁶ ip. 20x10 ⁶ sc.	84. Tag: 25x10 ⁶ ip.	112 Tag: 11x10 ⁶ ip. 11x10 ⁶ iv.	115. Tag
--------	-----------	---	------------------------------------	--	----------

25

30

RhCD7p	Molt-3*	0. Tag: 25x10 ⁶ ip. 25x10 ⁶ sc.	32. Tag: 40x10 ⁶ ip.	175. Tag 7x10 ⁶ ip. 7x10 ⁶ iv.	178. Tag
--------	---------	---	------------------------------------	--	----------

35

40

RhCD7q	stim. PBL	0. Tag: 10x10 ⁶ ip. 10x10 ⁶ sc.	49. Tag: 21x10 ⁶ ip.	112. Tag: 12x10 ⁶ ip. 12x10 ⁶ iv.	115. Tag
--------	-----------	---	------------------------------------	---	----------

45

⁺ PHA-stimulierte PBL
^{*} T-Zelllinie Molt-3 kultiviert im Normalmedium
[#] Anzahl der Zellen
⁻ intraperitoneal
[§] subkutan
[¶] intravenös

50

Sobald die wachsenden Klone ca. 10% der Kulturfläche überdeckten (nach ca. 7 Tagen), wurden die Kulturüberstände der einzelnen Löcher in einem Subklassen-spezifischen ELISA-Test auf das Vorhandensein von Ratten-IgG2b-Antikörpern untersucht (siehe Beispiel 2, Test I). Einen Tag später wurden die Kulturüberstände, die Ratten-IgG2b-Antikörper enthielten, hinsichtlich ihrer Zielzellspezifität in einem Zellbindungstest untersucht (siehe Beispiel 2, Test II). Die Zellen aus den Löchern, die T-zellspezifische Antikörper der Subklasse Ratten IgG2b enthielten, wurden einzeln auf 24-Loch-Kulturplatten überführt, expandiert und kryokonserviert.

55

Die Zielzell- und Antigenspezifität wurde in einem Doppelmarkierungsexperiment mit Referenzantikörpern gegen geeignete CD-Antigene ermittelt (siehe Beispiel 2, Test III).

60

Die Hybridomzelllinien, die die CD5- bzw. CD7-spezifischen Antikörper sezernierten, wurden wieder aufgetaut und bis zum Erreichen einer Monoklonalität bzw. einer stabilen Produktionsrate auf Einzelzellniveau in 96-Loch-Kulturplatten rekloniert. Zum Austesten der Überstände aus den Reklonierungen wurde ein subklassenspezifischer ELISA- (siehe Beispiel 2, Test I) oder ein Zellbindungstest (siehe Beispiel 2, Test II) durchgeführt.

65

Parallel mit den Reklonierungsschritten wurden die Antikörper hinsichtlich Antigenspezifität durch Immunpräzipitation (siehe Beispiel 2, Test V) exakt charakterisiert.

Dabei zeigte sich, daß RhCD5p und RhCD5q gegen das humane CD5-Antigen gerichtet ist, das auf praktisch allen peripheren T-Zellen und ca. 10% der B-Zellen im peripheren Blut exprimiert ist; RhCD7p und RhCD7q sind gegen das humane CD7-Antigen gerichtet, das auf den meisten humanen T- und NK-Zellen im peripheren Blut sowie auf myeloischen Verläuferzellen im Knochenmark exprimiert ist.

5 Durch Bindungsinhibitionsexperimente (siehe Beispiel 2, Test IV) wurde die relative Epitopspezifität der Antikörper untersucht. Daraus ergab sich, daß sich weder RhCD5p und RhCD5q noch RhCD7p und RhCD7q deutlich inhibieren. Sie binden daher an jeweils zwei unterschiedliche Epitope auf dem CD5- bzw. CD7-Antigen.

Nach der vollständigen Charakterisierung und entsprechenden Reklonierungsschritten wurde eine Zelllinie als Master Cell Bank (MCB) kryokonserviert. Aus jeder MCB wurde durch entsprechende Expandierungsschritte in Zellkulturflaschen eine Working Cell Bank (WCB) etabliert, die ihrerseits als Ausgangsmaterial für die Fertigung (siehe Beispiel 3) diente.

Die Zelllinien wurden am 3.2.1993 bei "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) Abt. Menschliche und Tierische Zelllinien" (Marscheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig, Germany) unter folgenden Nummern hinterlegt:

15

	<u>Antikörper</u>	<u>Zelllinie</u>	<u>Hinterlegungsnummer</u>
	RhCD5p	21/61	DSM ACC 2113
20	RhCD5q	26/III/17	DSM ACC 2112
	RhCD7p	23/5	DSM ACC 2115
	RhCD7q	25/II/3	DSM ACC 2114

25

Beispiel 2

Testsysteme zum Nachweis der Subklasse bzw. der Bindungsspezifität der Antikörper RhCD5p, RhCD5q, RhCD7p und RhCD7q

30

I. Subklassennachweis

Dafür wurde ein spezifischer ELISA-Test in 96-Loch-Flachbodenplatten durchgeführt. Als Fängerantikörper diente ein monoklonaler Mausantikörper, der spezifisch reagiert mit Ratten-IgG_{2b}-Antikörpern (ATCC 174). Als Nachweisantikörper diente ein polyklonaler, Peroxidase-konjugierter Maus-anti-Ratten-IgG-Antikörper (Dianova). Der Test wurde durch Zugabe von o-Phenyldiamindihydrochlorid (OPD) entwickelt und in einem ELISA-Reader ausgewertet.

40

II. Zellbindungstest

Dieser Test wurde als Zell-Immunoassay in 96-Loch-Rundbodenplatten durchgeführt. Eine T-Zelllinie (z. B. Molt-3; ATCC, CRL 1552) diente als positive Zielzelle, eine nicht-T-Zelllinie (z. B. HL-60; ATCC, CCL 240) diente als negative Zielzelle. Die Zellen wurden mit dem zu testenden Kulturüberstand inkubiert und anschließend gewaschen. Der Nachweis der Bindung des Antikörpers an die Zielzelle erfolgte durch Inkubation mit einem polyklonalen, Peroxidase-konjugiertem Maus-anti-Ratten-IgG-Antikörper (Dianova). Der Test wurde durch Zugabe von OPD entwickelt und in einem ELISA-Reader ausgewertet.

50

III. Fluoreszenzdoppelmarkierung

Dieser Test wurde in einem Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson) unter Verwendung des FSCScan-Programms durchgeführt. Eine natürliche Zellpopulation (z. B. Ficollgetrennte humane Blutzymphozyten) wurden mit dem zu testenden Kulturüberstand und gleichzeitig mit Biotin-markierten Maus-Referenzantikörpern (CD2: OKT11, ATCC, CRL 8027; CD5: Leu 1; CD7: Leu 9, beide Becton Dickinson) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit Phycoerythrinmarkiertem Avidin (Dianova) sowie FITC-konjugiertem, polyklonalem Ratte-anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova) inkubiert. Die Zellparameter (Fluoreszenz 1, Fluoreszenz 2, Forwardscatter, Sidescatter) wurden im Zytofluorometer gemessen und die Daten abgespeichert. Bei der Analyse wurden nur die Zellen durch Setzen eines entsprechenden Fensters in der Forward-versus-Sidescatter-Darstellung berücksichtigt, die aufgrund ihrer Größe und Granulation in die Lymphozytenpopulation fielen.

Aus der Lage und dem Verhältnis der doppelt-, einfach- und unmarkierten Zellen konnte man auf die Zell- und Antigenspezifität schließen. Dabei konnten folgende Konstellationen unterschieden werden:

- 1) Der zu testende Antikörper bildete mit keinem der Referenzantikörper eine signifikante doppelpositive Population: Der Testantikörper ist nicht T-zellspezifisch.
- 65 2) Der zu testende Antikörper bildete mit einem oder mehreren Referenzantikörpern eine flächige Verteilung:
zudem kann auch eine signifikante Anzahl an nur einfachpositiven Zellen auftreten: Der Testantikörper zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster wie der Referenzantikörper und erkennt T-Zellen. Bei den einfach-

positiven Zellen kann es sich um einfachmarkierte B- oder NK-Zellen handeln, was einen weiteren Hinweis auf die Antigenspezifität des Testantikörpers gibt.

3) Die doppeltmarkierte Zellpopulation liegt annähernd auf einer Diagonalen, zudem gibt es keine signifikante Population an einzelpositiven Zellen: Referenz- und Testantikörper binden an zwei unterschiedliche, aber gekoppelte exprimierte Epitope, die wahrscheinlich auf dem durch den Referenzantikörper definiertem Antigen liegen.

4) Die doppeltpositive Zellpopulation verschwindet zugunsten einer einfachpositiven Zellpopulation: Referenz- und Testantikörper inhibieren sich gegenseitig, d. h. sie sind gegen eng benachbarte bzw. sich überschneidende Epitope auf dem gleichen Antigen gerichtet.

5

10

IV. Bindungsinhibitionstest

Zur relativen Epitopcharakterisierung wurde ein Zell-Immunoassay durchgeführt. Geeignete Zielzellen (z. B. 3 Tage mit Phytohämagglutinin stimulierte Lymphozyten aus humanen Tonsillen) wurden sequentiell zunächst mit dem zu testenden Antikörper RhCD5p, RhCD5q und RhCD7p und RhCD7q bzw. mit Maus-Referenzantikörpern (CD5: Leu 1; CD7: Leu 9, beide Becton Dickinson) und anschließend mit dem Nachweisantikörper in 96-Loch-Rundbodenplatten inkubiert und gewaschen. Als Nachweisantikörper wurden die Rattenantikörper RhCD5p, RhCD5q, RhCD7p und RhCD7q verwendet, die zuvor über Protein-G-Sephadex (Pharmacia) gereinigt und mit einem 100-fachen molaren Überschuß an NHS-LC-Biotin (Pierce) markiert wurden. Der Nachweis der Biotin-markierten Rattenantikörper erfolgte durch Peroxidase-konjugiertes Avidin (Dianova). Der Test wurde mit OPD entwickelt und mit einem ELISA-Reader ausgewertet. Die maximale Bindung des Nachweisantikörpers wurde in Kontrollansätzen ohne kompetierenden Testantikörper bestimmt. Das Ausmaß der Inhibition wurde errechnet nach folgender Formel:

15

20

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - \frac{\text{OD}_{\text{Test}} - \text{OD}_{\text{Hintergrund}}}{\text{OD}_{\text{Kontrolle}} - \text{OD}_{\text{Hintergrund}}}] \times 100 \%$$

25

30

Dabei wurde eine vollständige Inhibition ($\geq 50\%$) als eine Überlappung der Bindungsepitope interpretiert, geringere Inhibitionswerte ($< 50\%$) als eine gegenseitige sterische Behinderung der beiden Antikörper aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur.

35

V. Immunpräzipitation und Westernblot

Dazu wurde eine humane T-Zell-haltige Zellpopulation (z. B. 3 Tage mit Phytohämagglutinin stimulierte Lymphozyten aus Tonsillen) mit NHS-LC-Biotin (Pierce) markiert und mit NP-40 lysiert (Schuh et al., J. Immunol. Meth. 1992, 152, 59). Die zu testenden Antikörper wurden gereinigt oder über einen Fängerantikörper an die Festphase in 96-Loch-ELISA-Platte geheftet und mit dem Biotin-markierten Zellsolubilisat inkubiert. Überschüssiges Material wurde durch intensives Waschen entfernt. Das spezifisch gebundene Antigen wurde mit einem Zitronensäurepuffer pH 2.7 in Anwesenheit von 1% SDS eluiert und einer Gelelektrophorese unterzogen. Als Molekulargewichtstandard diente ein gefärbtes Proteingemisch (LMW Biorad).

40

Anschließend wurde das Protein aus dem Gel auf Nitrocellulose-Papier transferiert und über Streptavidin-gekoppelte Phosphatase (Dianova) mit Echtfarbstoff sichtbar gemacht. Als Referenzantikörper diente Leu 1 (CD5) und Leu 9 (CD7; beide Becton Dickinson). Aus dem Vergleich der Bandenmuster zwischen Referenz- und Testantikörper konnte die Antigenspezifität nachgewiesen werden.

45

50

Beispiel 3

Produktion und Reinigung der monoklonalen Antikörper RhCD5p, RhCD5q, RhCD7p und RhCD7q sowie Herstellung des monoklonalen ATG-Cocktails

Die nach Beispiel 1 und 2 charakterisierten und als MCB bzw. WCB etablierten Zelllinien wurden einzeln in serumhaltigen Medium (RPMI 1640, 10% fötales Kälberserum, Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren, Na-Pyruvat) aufgetaut und in Kunststoffkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet. Danach wurden die Zellen auf serumfreie LP-Medium (Gibco) umgestellt, expandiert und in eine entsprechende Anzahl von 10er Wannenstapel (NUNC) überführt.

55

Die Fermentation erfolgte über einen Zeitraum von ca. 2 Monaten in einem Volumen von ca. 2 l pro Wannenstapel. Die Wannenstapel wurden dreimal wöchentlich semikontinuierlich geerntet, wobei zweimal 1.5 l und einmal 1 l zellhaltiger Kulturüberstand geerntet und durch frisches Medium ersetzt wurde. Die täglichen Ernten der parallel angesetzten Wannenstapel einer Zelllinie wurden gemeinsam zur Entfernung der Zellen aus dem Kulturüberstand über ein Glasfaservorfilter und ein Sterilfilter (0.22 µm) filtriert. Die filtrierten Kulturüberstände der Gesamtfermentation einer Zelllinie wurden nach Abschluß der Fermentation über ein Hohlfasermodul mit einer Ausschlußgrenze von 30 kD bis zu einem Antikörpergehalt von ca. 0,5 g/l eingeengt. Die Messung der Antikörperkonzentration erfolgte in einem Subklassen-spezifischen ELISA (siehe Beispiel 2, Test 1), wobei die Proben in einer seriellen Verdünnung austitriert wurden. Der Antikörpergehalt wurde rechnerisch ermittelt

60

65

durch Vergleich der Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe mit der Verdünnungsreihe eines Standardantikörpers der gleichen Stukklasse und bekannter Konzentration.

Die Reinigung erfolgte mittels FPLC-Anlage und gliederte sich in zwei Teilschritte:

Teilschritt 1 (Figur 1) beinhaltete eine komplexe Abfolge von fünf chromatographischen Schritten sowie einem Virus-Inaktivierungsschritt, wobei die Antikörper in Portionen von ca. 200 mg aus dem Kulturüberstand gereinigt wurden. Für die weitere Verarbeitung wurden nur solche Einzelreinigungen weiterverwendet, die einen Endotoxinegehalt < 0,03 EE/ml aufwiesen. Die Einzelreinigungen wurden getrennt für jeden der vier Antikörper zu Rohchargen vereinigt. Entsprechend ihrem Proteingehalt (photometrische Bestimmung: $c = (E_{235} - E_{280})/2,51$; Whitaker et al., Annual. Biochem. 1980, 104, 156) wurde aus diesen Rohchargen eine äquimolare Mischung der gereinigten Antikörper RhCD5p, RhCD5q, RhCD7p und RhCD7q hergestellt und auf eine Protein-Konzentration von 3 mg/ml eingestellt.

Teilschritt 2 (Figur 2) bezog sich auf eine weitere Behandlung der Gesamt-Mischung. Diese bestand aus einem chromatographischen Verfahren sowie einem weiteren Virusinaktivierungsschritt und endete in der Herstellung des sterilen Endprodukts.

Das sterile Endprodukt (mATG) wurde bei 4°C in Kunststoffflaschen aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die entsprechenden Volumina in silikonisierte, sterile 30 ml-Glasflaschen mit Gummistopfen umgefüllt und bei 4°C in auf rechter Stellung aufbewahrt.

Beispiel 4

Anwendung des Anti-CD5/Anti-CD7 monoklonalen Antikörperpräparates bei 2 Patienten mit refraktärer akuter Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT)

1. Eine 32 Jahre alte weibliche Patientin (A) wurde im beginnenden Rezidiv einer sekundären AML von ihrer HLA – DR differenten Mutter transplantiert. Die AML trat 6 Monate zuvor erstmals auf und mußte im Zusammenhang mit einer 6 Jahre zuvor durchgeföhrten Chemo- und Radiotherapie wegen eines M. Hodgkin als sekundäre AML betrachtet werden. Aufgrund des raschen Rezidivs der AML wurde auf die Suche nach einem optimal passenden Spender verzichtet und trotz des erhöhten GvHD-Risikos die HLA – DR haploidentische Mutter als Knochenmarkspenderin gewählt.

Die Patientin entwickelte am 14. Tag nach KMT eine GvHD Grad II der Haut und der Leber bei begleitender Cytomegalie-Virus-assoziierten interstitieller Pneumonie. Die GvHD wurde zunächst mit hochdosierten Steroiden und einem monoklonalen Antikörper gegen TNF α behandelt. Die Hautsymptomatik erwies sich als primär refraktär und erforderte am Tag 20 eine 7-tägige weitere Behandlung mit OKT3, nach nur kurzem Ansprechen hierauf am Tag 29 eine 10-tägige Behandlung mit polyklonalem ATG. Die Begleithandlung mit Corticosteroiden und Ciclosporin wurde in Erhaltungsdosen fortgeführt, zusätzlich wurde einmal pro Woche Methotrexat in einer niedrigen Dosis appliziert. Nach erneutem vorübergehenden Ansprechen auf ATG verschlechterte sich die Hautsymptomatik ab Tag 48 nach KMT erneut, weshalb ein zweiter Zyklus mit OKT3 für 10 Tage und eine Erhaltungstherapie mit Thalidomid angesetzt wurde. Infolge der OKT3-Therapie trat eine generalisierte Mikroangiopathie mit Hämolys, Thrombopenie und Blutungsneigung auf, die die Gabe von Frischplasma erforderte.

Bei persistierendem Hautexanthem und ansteigenden Cholestase-Parametern wurde von Tag 69 bis 75 ein Behandlungsversuch mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Interleukin-2-Rezeptor (IL2-Rezeptor) durchgeföhr, der keine Wirkung zeigte. Daraufhin wurden von Tag 76 bis Tag 85 jeweils täglich 20 mg des erfundungsgemäßen monoklonalen anti-CD5/anti-CD7-Antikörperpräparates (in 500 ml isotonischer Kochsalzlösung) appliziert. Diese Behandlung erschien trotz der vorbestehenden radiologischen Zeichen pulmonaler Infiltrate wegen des refraktären Verhaltens der GvHD indiziert, sie wurde unter breitem antibiotischen und antimykotischen Schutz durchgeföhr. Am 1. Tag der Behandlung mit dem erfundungsgemäßen Antikörperpräparat kam es 1 Stunde nach Infusionsende zu einer geringgradigen Dyspnoe der Patientin, die ohne zusätzliche Maßnahmen nach weiteren 30 Minuten sistierte. Die folgenden Applikationen des Antikörperpräparates wurden ohne akute Reaktionen vertragen. Im Verlauf der Behandlung mit dem erfundungsgemäßen Antikörperpräparat bläbte das Hautexanthem ab, die Besserung zeigte sich ab dem 4. Behandlungstag. Die initial als Ausdruck einer Leber-GvHD erhöhte alkalische Phosphatase (AP) im Serum fiel von 469 U/ml auf 339 U/ml am Ende des Zyklus ab. Die Leukozyten blieben unter der Antikörper-Gabe stabil, die vorbestehende Thrombopenie sowie die plasmatische Gerinnung wurde nicht nachteilig beeinflußt. Im Verlauf entwickelte die Patientin am Tag 89 eine zunehmende Dyspnoe, die auf die bereits vor Therapie bestehenden pulmonalen Infiltrate zurückzuführen war. Dadurch wurde die Patientin beatmungspflichtig. Während der intensivmedizinischen Behandlung kam es erst ab dem Tag 100 nach KMT wieder zu einer Progression der Hautsymptomatik der GvHD, die wegen der zunehmenden pulmonalen Verschlechterung, der die Patientin schließlich erlag, nicht mehr behandelt wurde.

2. Ein 31 Jahre alter männlicher Patient (B) wurde in akzelerierter Phase einer chronisch-myeloischen Leukämie von einem HLA-identen Fremdspender knochenmarktransplantiert. Komplizierend lag als Folge des 9-jährigen Verlaufs der Erkrankung eine Myelofibrose mit sekundärer Hapato- und Splenomegalie und Zeichen der Leberschädigung vor. Dieser Patient entwickelte am Tag 16 nach KMT eine GvHD Grad II – III von Haut und Leber, die unter Fortführung der Ciclosporin-Prophylaxe zunächst mit anti-TNF-Antikörper und hochdosierter Steroide-Gabe behandelt wurde. Bei progredientem Bilirubin- und Transaminasen-Anstieg unter dieser Behandlung wurde am Tag 20 ein 7-tägiger Zyklus mit ATG zugesetzt. Während das Bilirubin im Verlauf zunächst rückläufig war, flammte das Hautexanthem am Tag 32 nach KMT erneut im Sinne eines Grad III der akuten GvHD auf, so daß eine Behandlung mit OKT3 unter Pentoxifyllin-Schutz erforderlich wurde. Auch diese Behandlung zeigte nur einen vorübergehenden Effekt, ab dem Tag 52 traten Zeichen der Haut-, Darm- und Leber-GvHD (jeweils Grad III, damit Gesamtgrad der GvHD IV) auf, so daß die Behandlung mit dem

erfindungsgemäßen Antikörperpräparat (20 mg/Tag) am Tag 55 begonnen wurde. Am 1. Tag der Antikörper-Verabreichung kam es 1 Stunde nach Infusions-Ende zu Symptomen der pulmonalen Spastik sowie einer Sinustachykardie, die selbstlimitiert waren und nach etwa 30 Minuten sistierten. Bereits am 3. Tag der Gabe des erfindungsgemäß verwendeten Antikörperpräparates war die Haut-GvHD des Patienten deutlich rückläufig (Grad I-II), und die Diarrhoen sprachen mit einem Rückgang von über 1400 ml auf weniger als 500 ml an. Wegen eines zunehmenden Anstiegs der bereits vor Therapiebeginn mit einer Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) von über 150 U/ml erhöhten Transaminasen auf maximal 1000 U/ml wurde die Therapie am 4. Tag unterbrochen, da zu diesem Zeitpunkt eine zusätzlich zur GvHD bestehende Virushepatitis nicht ausgeschlossen werden konnte. Wiederum konnten bei Verabreichung des erfindungsgemäßen Antikörperpräparates keine negativen Effekte auf das Blutbild beobachtet werden. 3 Tage nach Unterbrechung der Applikation des Antikörperpräparates war die Hautsymptomatik im Sinne des Lyell-Syndroms erneut progredient, die Werte stiegen auf über 8 mg/dl an, so daß erneut hochdosiert Steroide sowie ATG eingesetzt wurden. Das Lyell-Syndrom sprach auf die ATG-Gabe nicht an, so daß von Tag 72 bis 76 nochmals das erfindungsgemäße Antikörperpräparat kombiniert mit anti-TNF appliziert wurde. Während hierunter das Lyell-Syndrom zum Stillstand kam, stand jetzt ein zunehmendes hepatorenales Syndrom im Vordergrund, der Patient verstarb am Tag 77 mit den Zeichen der Leber- und Niereninsuffizienz.

Bei einem 22 Jahre alten männlichen Patienten C wurde eine allogene KMT von einem HLA-identen Fremdspender wegen einer chronisch myeloischen Leukämie durchgeführt. Der Patient entwickelte bereits ab dem 10. Transplantationstag eine akute GvHD der Haut, die zunächst mit Corticosteroiden und anti-TNF-Antikörper unter Fortführung der Ciclosporinprophylaxe behandelt wurde. Nach primärem Ansprechen der Haut auf diese Behandlung zeigte sich unter Corticoidreduktion ab dem 34. Tag nach KMT eine erneute Zunahme, die die Behandlung mit polyklonalem ATG erforderlich machte. Auch diese Behandlung führte nur zu einer vorübergehenden Stabilisierung der Haut-GvHD, bei mäßiger Aktivität wurde zunächst eine Erhaltungstherapie mit Corticosteroiden, CsA und wöchentlichen Gaben von MTX versucht. Bei eindeutiger Progression der Symptomatik wurde am 83. Tag nach KMT zusätzlich Thalidomid eingesetzt, diese Behandlung mußte allerdings wegen einer transiente neurologischen Symptomatik im Sinne von Parästhesien im Trigeminusbereich nach wenigen Tagen wieder abgebrochen werden. Bei progredientem Hautexanthem wurde deshalb die Indikation zur Gabe des erfindungsgemäßen Präparates (Cocktail) nach Ausschöpfung der konventionellen Therapiemaßnahmen gesehen und mit dem Patienten eingehend besprochen. Vom 91. bis 98. Tag nach KMT wurden deshalb jeweils 2 x 7,5 mg des Cocktails appliziert, auch hier kam es unter den ersten Antikörpergaben jeweils zu kurzfristiger Dyspnoe durch Spastik sowie zur Urtikaria, die rasch auf Fenistil ansprach. Bei im weiteren Verlauf guter Verträglichkeit bildete sich das Hautexanthem allmählich zurück. Am 99. Tag nach KMT traten akute Wortfindungsstörungen sowie Kopfschmerzen auf, ein daraufhin durchgeföhrtes CCT zeigte hypodense Areale, die mit einer cerebralen Toxoplasmose vereinbar schienen. Die Therapie mit dem Cocktail wurde aufgrund dieser Entwicklung nicht fortgeführt, wobei ein kausaler Zusammenhang mit der Applikation des Cocktails unwahrscheinlich erscheint, da bereits vor Therapiebeginn neurologische Symptome aufgetreten waren. Die cerebrale Toxoplasmose konnte im weiteren Verlauf bestätigt werden, der Patient entwickelte vier Monate nach KMT auf dem Boden dieser Herde eine cerebrale Blutung, an der er schließlich am 124. Tag nach KMT verstarb. Im ganzen Verlauf war dabei die Haut-GvHD des Patienten trotz allmäßlicher Reduktion der Steroidmedikation nicht mehr aufgeflammt, so daß von einer dauerhaften Wirkung des Cocktails ausgegangen werden muß.

Zusammenfassend kann zur Wirksamkeit des erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörperpräparates (anti-CD5/anti-CD7) bei den Patienten A und B festgestellt werden:

- a) Bei den Patienten trat trotz einer massiven Vorbehandlung mit verschiedenen anti-T-Zell-Antikörpern bei Gabe von 20 mg/Tag (Patient A und B) bzw. von 2 x 7,5 mg/Tag (Patient C) des erfindungsgemäßen Antikörperpräparates eine Besserung der GvHD-Symptomatik auf, die bei dem Patienten B an Haut und Darm rasch und extrem eindrucksvoll war und bei Patient C an der Haut über 25 Tage nach Absetzen der Therapie anhielt.
- b) Die Akut-Verträglichkeit des erfindungsgemäß verwendeten Antikörperpräparates war im Vergleich zur Gabe von OKT3, die nur unter zusätzlichem Schutz mit anti-TNF-Antikörpern, hochdosierten Steroiden und/oder Pentoxyfyllin durchgeführt werden kann, deutlich besser. Insbesondere kam es nicht zu der bei OKT3 regelmäßig auftretenden Hyperpyrexie oder Zeichen der respiratorischen Insuffizienz, zudem waren die beobachteten, als Ausdruck einer First-Dosis-Reaktion interpretierten Symptome in beiden Fällen transient und nicht behandlungsbedürftig.
- c) Hämatologische Nebenwirkungen wie unter der Gabe von ATG und OKT3 beschrieben konnten nicht beobachtet werden.
- d) Die Verläufe mußten bei den Patienten als schicksalhaft betrachtet werden. Die pulmonalen Infiltrate bei der Patientin A sowie die Leberschädigung bei dem Patienten B sowie die cerebrale Toxoplasmose beim Patienten C waren vorbestehend Interstitielle Pneumonie sowie Leberinsuffizienz sind häufige Todesursachen bei Patienten mit refraktärer GvHD und einerseits direkt mit der GvHD assoziiert, andererseits als Folge einer über Monate dauernden immunsuppressiven Behandlung zu werten.
- e) Aufgrund der Anwendungsbeobachtungen kann ausgesagt werden, daß das erfindungsgemäße Antikörperpräparat bei ausreichender Akut-Verträglichkeit die erwünschte Wirkung erzielte und über die geschilderten Veränderungen hinaus keine weiteren Toxizitäten hinsichtlich der Hämatopoiese oder wichtiger Organfunktionen auftreten.

Beispiel 5

Der 20 Jahre alte Patient D wurde zur allogenen KMT in 2. Remission einer T-ALL überwiesen. Bei Aufnahme zeigte er bereits wieder ein Rezidiv der Grunderkrankung mit multiplen bis fünfmarkstückgroßen Hautinfiltraten im Stammbereich und einer Vermehrung der Blastenzahl im peripheren Blut auf 4%. Da der Patient während vorangehender Chemotherapien schwere Komplikationen im Sinne einer Pneumonie mit ARDS erlitten hatte, erschien eine erneute Chemotherapie vor Durchführung der KMT zu riskant, andererseits war bei Beginn der Konditionierung ohne voraus gehende Tumorreduktion eine ungünstige Ausgangssituation für die KMT zu befürchten. Da die leukämischen Zellen des Patienten beim Rezidiv die T-Zell-Marker CD5 und CD7 getragen hatten, entschloß man sich in dieser Situation nach eingehender Aufklärung des Patienten zur Durchführung einer Behandlung mit dem Cocktail zur Tumorreduktion: Der Cocktail wurde über drei Tage in einer Dosis von 2 x 7,5 mg/Tag appliziert. Zur Vermeidung von First-Dose-Reaktionen, die aufgrund der gewünschten Zerstörung der großen Tumormasse zu erwarten war, wurde von der 1. Applikation Prednisolon in einer Dosis von 100 mg appliziert: Unmittelbar nach Ende der 1. Cocktail-Infusion klagte der Patient über Juckreiz, der innerhalb weniger Minuten von der Ausbildung einer fleckigen Urtikaria zum Teil im Gebiet der Leukämieherde, zum Teil im gesunden Hautbereich gefolgt wurde. Gleichzeitig gab der Patient eine erschwere Atmung an, die die Gabe von Sauerstoff erforderlich machte. Nach Gabe von Antihistaminika und 2 x 100 mg Prednisolon besserte sich die Urtikaria innerhalb von 10 Minuten, die Dyspnoe nach etwa einer Stunde. Weitere Reaktionen wie Fieberanstieg oder Herzrhythmusstörungen wurden nicht beobachtet, die weiteren Antikörpergaben wurden ohne jegliche Reaktion gut vertragen. Bereits am 2. Tag der erfindungsgemäßen Behandlung zeigten die größeren Hautinfiltrate einen deutlichen Rückgang sowohl der Ausdehnung als auch der Dicke, der sich im weiteren Verlauf fortsetzte. Am vierten Tag, dem Tag der ersten Ganzkörperbestrahlung zur KMT, waren sie praktisch nicht mehr nachweisbar. Parallel dazu zeigte das periphere Blutbild am zweiten Tag der Verabreichung des erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörperpräparates ein Verschwinden der zirkulierenden Blasen, das Knochenmark am vierten Tag der Behandlung eine Vollremission. Insgesamt muß davon ausgegangen werden, daß die Applikation des Cocktails zu der beabsichtigten Tumorreduktion bei Ausbleiben schwerer Reaktionen im Sinne eines Tumorlysesyndroms führte. Der weitere Transplantationsverlauf war bis auf eine ab dem vierten bis zum sechsten Tag bestehende Kollapsneigung, die am ehesten einem postfunktionalen Syndrom nach Liquorpunktion zuzuordnen war, komplikationsarm. Der Patient konnte kurze Zeit später mit normaler hämatologischer Rekonstitution und dem Bild einer Vollremission in die ambulante Betreuung entlassen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das erfindungsgemäße monoklonale Antikörperpräparat bei ausreichender Akut-Verträglichkeit die erwünschte Wirkung einer Vollremission erzielte und über die geschilderten Veränderungen hinaus keine weiteren Toxizitäten hinsichtlich der Hämatopoese oder wichtiger Organfunktionen auftraten.

Patentanspruch

Hybridom-Zellen entsprechend DSM ACC 2113, DSM ACC 2112, DSM ACC 2115 und DSM ACC 2114.

40

45

50

55

60

65